Feel so Bio キットシリーズ

#010 タンパク質泳動キット

取扱説明書

1-101-001

目次

本キットの特徴

本キットを用いて、タンパク質を分子量毎に分離する SDS-PAGE (Sodium Dodesyl Sulfate - Poly Acrylamid Gel Electrophoresis) 実験を体験することが出来ます。

生体を維持するために必要な呼吸や代謝などの反応は、様々な生物種で共通に見られます。これら反応中で触媒としての機能を果たしているのがタンパク質(酵素)であり、様々な生物種で同じ名前を持つタンパク質が働いています。これら同じ名前を持つタンパク質は、実は触媒としての機能に重要な部分は非常に似ているものの、生物種によって形や大きさ、アミノ酸の組成などが異なっていることが知られています。

SDS-PAGE 実験は、タンパク質の機能や性質を調べる実験には必要不可欠な実験法で、タンパク質を大きさによって分離し、観察することが出来ます。

この手法を用いて様々な動物、植物、微生物のもつタンパク質を比較することで、それぞれが持つタンパク質が大きく異なることを学ぶことが出来ます。また動物、植物、微生物の各分類中の生物同士において、それぞれが持つタンパク質を比較をすることで、それぞれ似たタンパク質をもっていても、全く同じものを同じ比率で持っている訳ではないことを学ぶことが出来ます。そして同一生物の組織間の比較を行うことで、核の全能性によって DNA はどの組織にも同じものが有るにもかかわらず、作られているタンパク質が異なることを学ぶことが出来ます。

キット使用時に必要な試薬機材の一覧

キット内容 【生徒 20 名（2 人 1 組、2 組1班、5 班）分】

・サンプル調整バッファー	1000 μL
・10 倍濃縮電気泳動バッファー	100 mL
・タンパク質分子量マーカー	50 μL
・染色液	100mL
・マイクロチューブ	50 本
・ホモジナイザー	5 本
・取扱説明書（本書）	1 冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・マイクロピペット　20 μL 用	5 本（各班 1 本）
200 μL 用	5 本（各班 1 本）
・マイクロピペット用チップ	5 箱（各班 1 箱）
・カッター	5 本（各班 1 本）
・タイマー	5 個（各班 1 個）
・電気泳動槽	1~2 台
※ATTO 株式会社 Compact Page を推奨	
・ポリアクリルアミドゲル	2 枚
※ATTO 株式会社 Compact Gel を推奨	
・熱湯(80℃以上)	
・フロート	
・精製水	適量
・染色用容器(10cm×10 cm×4cm 程度)	1個
・ビニール手袋	1組
・薬さじ	1 本
・サンプル(野菜、肉、魚、乳製品など)	5 種類~10 種類

※機材につきましては弊社でレンタル・販売しております。ご入用の際にはお問合せ下さい。

内容物について

サンプル調整バッファー

タンパク質の還元剤と SDS(強い界面活性剤)が入っており、タンパク質を変性させることが出来ます。また、電気泳動時の印として色素が入っています。

10 倍濃縮電気泳動バッファー

タンパク質を電気泳動するために界面活性剤と塩が入っています。使用時には精製水で 10 倍に希釈してください。

タンパク質分子量マーカー

分子量既知のタンパク質が 6 種類入っており、サンプル中のタンパク質の分子量を推定する目安となります。

染色液

クマシーブリリアントブルー(CBB)色素と酸が入っています。強い匂いを発し、衣服や肌に付着すると非常に落ちにくいので、取り扱いには注意してください。

マイクロチューブ

タンパク質サンプルを調整する際に用います。

事前準備

本実験キットでは4人1班(実験は 2 人1組)を推奨しています。

機材1班分の試薬・機材

サンプル調整

・	サンプル調整バッファー	70 μL
・	マイクロチューブ	70 μL
・	ホモジナイザー	1 本
・	マイクロピペット 20μL 用	1 本
・	マイクロピペット 200μL 用	1 本
・	マイクロピペット用チップ	1 箱
・	熱湯入りビーカー	1 個
・	サンプル(野菜、肉、魚、乳製品等)	適量

電気泳動実験

・	希釈後電気泳動バッファー	70 μL
・	タンパク質分子量マーカー	70 μL
・	マイクロピペット 20μL 用	1 本
・	マイクロピペット用チップ	1 箱

全体で **1** セット用意するもの

▪	電気泳動槽	1~2 台
▪	10 倍濃縮電気泳動バッファー	300 mL (10 倍希釈後)
▪	ポリアクリルアミドゲル	2 枚
▪	タンパク質分子量マーカー	50 μL
▪	染色液	100ml
▪	染色用容器	1 個
▪	水(水道水可)	適量
▪	ビニール手袋	適量
▪	薬さじ	1 本

※使用する電気泳動槽により必要量が変わります。本実験では、ATTO 株式会社の電気泳動槽、Compact Page の使用を想定しております。この商品は 12 穴のアガロースゲルを 1 枚処理することが可能です。

サンプル調整の準備

1) 熱湯の準備
サンプル中のタンパク質を変性させるため、80 度以上の熱湯が必要です。電気ポットや電子レンジ、ガスバーナーなどを使って熱湯を用意してください。

2) 試薬、サンプルの準備
各試薬をマイクロチューブや試験管を用いて所定の量に分け、班数分を用意します。内容物が微量なものはマイクロチューブの蓋についていることがあります。その際には、手で振ってマイクロチューブの底に溶液を集めてから分注して下さい。
実験に用いるサンプルは事前に購入してください。

電気泳動実験の準備

1） 電気泳動バッファーの調整
10 倍濃縮電気泳動バッファー(50ml)を 450mL の水で 10 倍に希釈します。

2） ポリアクリルアミドゲルの準備
市販のポリアクリルアミドゲルを用いる場合にはゲルの硬さはアクリルアミド含有量 12.5%を推奨します。また、お持ちの電気泳動槽の大きさに適したゲルを購入するようにしてください。ご自分で作製される場合にはアクリルアミド含有量を upper gel は 5％、lower gel は 12.5％になるように作製してください。

実験手順

サンプル調整

1) サンプル、試薬の準備

野菜等植物サンプルであれば 20mg(薬物であれば 3mm 平方、根菜などは2mm立法程度)、肉や豆腐などであれば5mg(1mm立法程度)をカッターで切り取り、サンプルチューブに入れます。ホモジナイザーでサンプルを念入りに潰した後にサンプル調整バッファーを50μL 入れてよく混ぜてください。

※ ホモジナイザーはサンプルの種類が変わるたびに水洗いし、付着したサンプルを取り除いてください。

※ ホモジナイズは手早く行って下さい。時間をかけすぎるとサンプルの温度が上がり、含まれるタンパク質が分解される恐れがあります。

※ サンプル調整バッファーには界面活性剤が入っていますので、泡があまり立たないように混ぜてください。

2) 熱湯処理

事前に準備した熱湯に、マイクロチューブの下半分を浸します。サンプル調整バッファーに含まれる成分でタンパク質は有る程度変性されますが、更に熱湯に 5 分浸けることで十分に変性されます。熱湯処理後のサンプルは冷凍して保存してください。

※熱湯によってチューブ中の空気が膨張してフタが開き、中身が勢いよく飛び出す場合がありますので、本工程は生徒の机から少し離れた場所で行うか、もしくはチューブのふたをきつく閉め、カラーテープ等で止めてから熱湯処理するようにしてください。

電気泳動実験の手順

1）電気泳動槽の準備

(ATTO 社 Compact Page を用いた場合)電気泳動槽に希釈した電気泳動バッファーを 50ml 加え、ポリアクリルアミドゲルをセットします。水位がゲルの最上部にくるまで、陰極側に更に希釈した電気泳動バッファーを加えます(50ml 程度)。なお、使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください。

2）サンプルのアプライ

サンプルを別々のウェルに注入（アプライ）します。チップをウェルの上部にセットし、ゆっくりとサンプルをウェルの中に押し出してください。なお、ATTO 社 Compact Gel を用いた場合のサンプル量の上限は 10μL 程度です。

3）SDS-PAGE

電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。タンパク質はプラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください。なお、ATTO 社 Compact Page を用いた場合は 30 分程度で終了します。

4）ゲルの染色

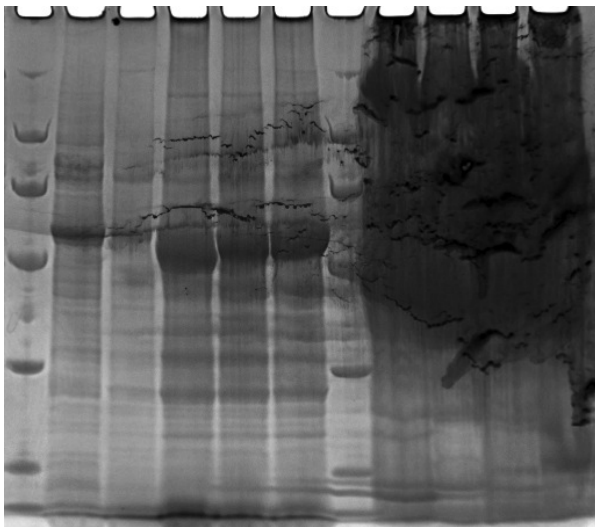
ポリアクリルアミドゲルが挟まれている 2 枚のガラスの間に薬さじを入れ、捻ることでポリアクリルアミドゲルを取り出します。ゲルは破れないように注意して扱い、染色液を入れた染色用容器の中に移して 10 分間染色を行います。均等に染色されるように、染色用容器を定期的に振とうして下さい。

5）ゲルの脱色

染色が終わったらまずは染色液をもとの容器に戻し、染色用容器に水(水道水でも可)を入れて捨てることを 2~3 回繰り返し、残った染色液を洗い流します。その後は 5 分毎に水を交換し、タンパク質のバンドがはっきりと見えるまで繰り返してください。サンプルの量や水温などによって脱色の時間は変動しますが、平均的に 20 分程度でバンドが確認できるようになります。ゲルが流れ出ないように注意してください。

指導のポイント

サンプル調整

1) タンパク質の泳動実験ではサンプル中のタンパク質の量が多く、濃くなりがちです。タンパク質が多すぎると、以下の写真のレーン⑧～⑪のように、鮮明なバンドが観察できない場合があります。もし写真のようなバンドが得られた際には、サンプルバッファーで適宜希釈をして再度電気泳動実験を行って下さい。

① マーカー
② ハクサイ
③ キャベツ
④ コマツナ
⑤ ミズナ
⑥ チンゲンサイ
⑦ マーカー
⑧ 牛肉
⑨ 豚肉
⑩ 鶏肉
⑪ 豆腐

2） サンプルは微量でも多くのタンパク質を含んでいます。カッターにサンプル付着したまま他のサンプルを切断したり、ホモジナイザーを洗浄せずに異なるサンプルをすりつぶしたりすることでサンプルが混ざってしまわないように心がけましょう。

電気泳動実験

1） サンプルを注入するためのウェルは非常に小さく、またガラスに挟まれてチップの先が入っていきません。初めて本実験を行うときには多めにゲルを用意しておき、実験前にどのウェルにどのサンプルを入れるかを油性ペンで記入したり、水で希釈したサンプル調整バッファーを使って注入の練習をするといいでしょう。

2） ポリアクリルアミドゲルは非常に薄くやわらかいため、扱い方によっては破れてしまうことがあります。慎重に扱うようにしてください。

3）染色液を扱うには、必ずビニル手袋をつけて下さい。CBB 色素は安全な試薬ですが皮膚に付着するとしばらくの間、色が落ちないことがあり、衣服などに付着した場合はなかなか脱色することは出来ません。

片付け

1） 余った試薬類は、普通ゴミとして廃棄可能です。

2） 使用したチップやチューブはそのまま廃棄するとゴミ袋が破れてしまう可能性があるので、2 重にした小さな袋などにまとめて、プラスチックゴミとして廃棄して下さい。

3） 使用済みの電気泳動バッファーは、水道に流して捨てることができます。

4) 使用後のポリアクリルアミドゲルはガラスとゲルに分け、ガラスはガラスとして廃棄してください。ゲル自体には危険性はありませんが、各施設や自治体によって処理の方法が異なる場合がございますので、廃棄に際しては各施設のご担当の方、もしくは各自治体の清掃局などにお問い合わせください。

5） 染色液は 20 回程度の再利用が可能です。廃棄の際は水で十分に薄めて、水道に流して捨てることができます。

付録 1　SDS-PAGE とは

SDS-PAGE は Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamid Gel Electrophoresis の頭文字をとった実験法で、日本語では SDS(界面活性剤の名前)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法といいます。

ポリアクリルアミドはアクリルアミドのモノマーが重合したもので、微細な網目状の構造をとっています。この中をタンパク質が電気泳動で陽極に移動することでふるいにかけられ、分子量が大きくなるにつれて移動度が減り、タンパク質を分子量ごとに分けることが出来るのです。

また、タンパク質は機能を持つために立体構造をとっています。このため、このままポリアクリルアミドの中を移動させると、構造によっては大きい分子量のもののほうが小さい分子量のものよりも早くすり抜けていくという現象が起こりえます。そこで、サンプル調整バッファーの中にはタンパク質の還元剤として DTT(dithiothreitol)が入っており、タンパク質の立体構造に重要な働きをしているシステイン結合を切断します。また、SDS は界面活性剤としてタンパク質の変性を行います。最後に 80 度以上の熱湯でタンパク質を処理することで、タンパク質を十分に変性させることでタンパク質の立体構造を壊します。

なお、タンパク質は 20 種類のアミノ酸で構築されており、アミノ酸の組成によって異なる電荷を持っています。このまま電気泳動を行うとアミノ酸の組成によっては分子量ごとに分離できない場合もあります。SDS はマイナスの電荷を帯びており、変性して 1 本鎖になったタンパク質に対し、分子量に比例する量の SDS が結合するという性質を持っています。これによってタンパク質の分子量にほぼ比例するマイナスの電荷が生まれ、電気泳動によって分子量によるタンパク質の分離を行うことが出来るのです。

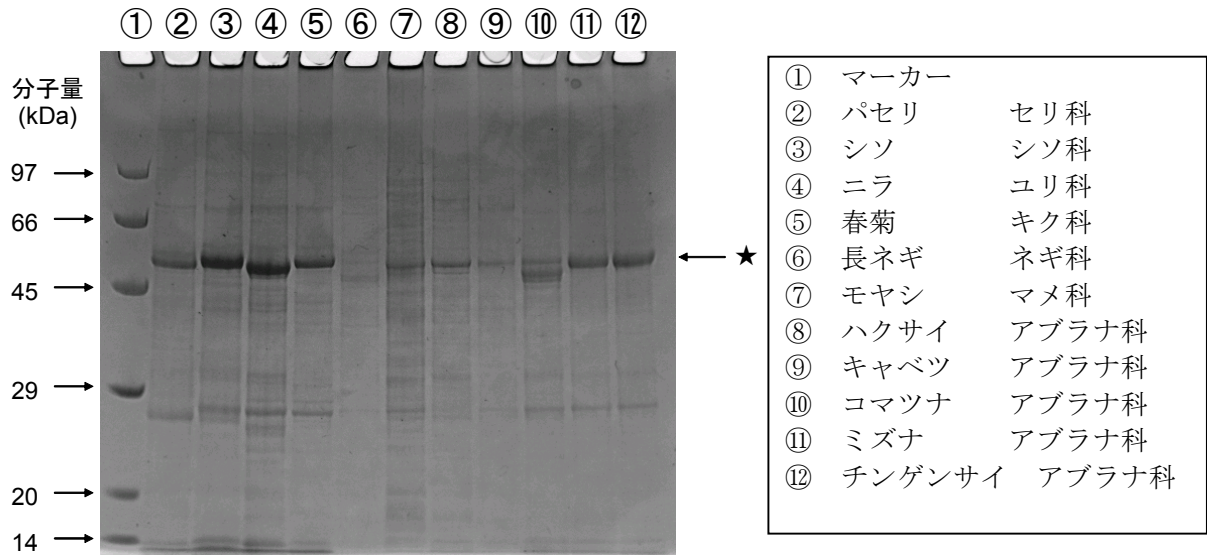
付録 2　アクリルアミドとは

アクリルアミド (acrylamide) はアクリル酸を母体とするアミドの一種です。神経毒性・肝毒性を有し皮膚からも吸収されるため、毒物及び劇物取締法上の劇物に指定されており、取扱いには注意を必要とします。また、変異原性（発がん性）も認められ、PRTR 法の第一種指定物質となっています。

SDS-PAGE で用いるポリアクリルアミドゲルは、アクリルアミドを重合させた、高分子化合物であるポリアクリルアミド (polyacrylamide) が主成分です。ポリアクリルアミド自体にはアクリルアミドのような毒性は認められないとされていますが、微量の未重合のアクリルアミドモノマーがポリマー内に残留している可能性もあるため、ゲルを扱う際には手袋を着用し、皮膚や口内などの粘膜に接することがないように気をつけるようにしてください。

付録 3　タンパク質の比較

以下に我々が行った実験の例を示します。

1)　野菜のタンパク質比較

★で示したバンドはRubiscoのLarge subunitというタンパク質で、光合成における暗反応で二酸化炭素をカルビン回路に取り込む際に働く、植物にとって非常に重要な酵素です。上に示した②～⑦を比較すると、科が別々だとRubiscoと呼ばれるタンパク質でも大きさに違いがあることが分かります。また、⑧～⑫は同じアブラナ科の植物ですが、その中でも大きさに違いがあります。これはタンパク質の機能に必要な部分は保存され、

なお、この写真では他のバンドは薄く出ていますが、サンプルの濃さを変えて泳動することで他の分子量のバンドも比較することが可能です。

付録 4　マイクロピペット

マイクロピペットは、微量の液体を正確に測り取るための器具です。使用方法はメーカーによって多少異なります。ここでは最も一般的なものについて説明します。

1）目盛りを見ながら、数値が測り取りたい量になるまでダイアルを回して下さい。目盛りは、200mL 用の場合は上から百の位、十の位、一の位、20mL 用の場合は十の位、一の位、1/10 の位になっています。例えば図のような目盛りの場合、200 mL 用だと 85 mL、20 mL 用だと 8.5 mL を示しているになります。

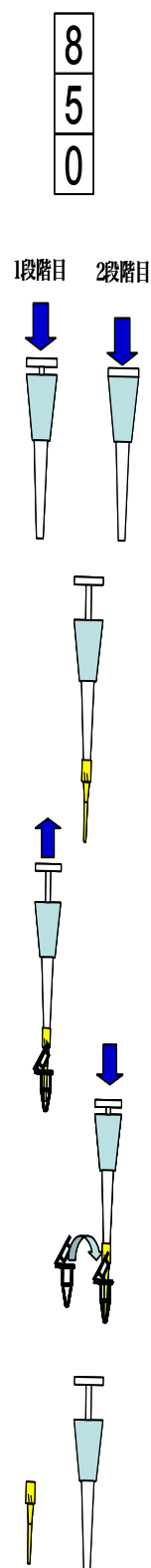
シャフトには軽い力で押し込める 1 段階目と、強い力で押し込める 2 段階目があるので、まずはそれを確認して下さい。試薬を取る際は 1 段階目で止めます。2 段階目まで押し込んでしまうと、設定した容量よりも多くの液体を吸ってしまいます。

2）マイクロピペットの先端をチップの口に押し込み、しっかりとチップをはめて下さい。これで準備は完了です。

3）シャフトを一段階目まで押し込んだ状態で、チップの先端を溶液中に入れてゆっくりとシャフトを上げると、チップ中に溶液が入っていきます。

※ここで一気にシャフトが上がると、チップ中に空気が入りやすくなりますので注意して下さい。

4）溶液を吸ったチップの先端を新しいチューブに入れてシャフトを押し込むと、溶液をはき出せます。このとき溶液を完全にはき出すために、シャフトを二段階目まで押し込んで下さい。シャフトを押したままチップの先を液体から出します。

5）使用済みのチップをマイクロピペットから外して捨てて下さい。溶液の混入をふせぐため、異なる溶液を取る際は必ずチップを交換して下さい。

免責事項

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載された手順以外でのご使用につき発生したいかなる損害に関して、当社は一切の責任を負いません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

アフターサポート『バイオレスキュー』

ご購入後 3 ヶ月間（ご購入月を含む）無料でご利用いただける、アフターサポートサービスです。大学や研究機関等でバイオの研究に携わる、若手研究者が実験手順や先端科学に関する知識面のサポートをいたします。

サポートを担当するのは、リバネスが実施する先端科学実験教室のノウハウを持つスタッフでもありますので、授業内で行う実験カリキュラム等に関するご相談も承っております。気軽にご利用いただけるサービスですので、少しでもご不明な点がございましたらぜひご利用下さい。

Feel so Bio シリーズ　カスタマーサポート係

TEL:03-6277-8041

FAX:03-6277-8042

Mail:info@feelsobio.net

※FAX をご利用の場合は、同封の FAX 用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

お問い合せ先

〒160-0004
東京都新宿区四谷 2-11-6 VARCA 四谷 10 階
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042
URL:http://www.leaveanest.com/